



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : A61K 7/00, 7/48, 9/127 A61K 35/08, 47/34	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 92/06666 (43) Date de publication internationale: 30 avril 1992 (30.04.92)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR91/00805 (22) Date de dépôt international: 16 octobre 1991 (16.10.91) (30) Données relatives à la priorité: 90/12811 17 octobre 1990 (17.10.90) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): PIERRE FABRE COSMETIQUE [FR/FR]; 45, place Abel-Gance, F-92100 Boulogne (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : FABRE, Pierre [FR/FR]; 1, avenue d'Albi, F-81100 Castres (FR). COUSSE, Henri [FR/FR]; La Foun de las Nobios, Chemin de Lastinos, F-81100 Castres (FR). MOUZIN, Gilbert [FR/FR]; 11, rue des Pénitents-Blancs, F-31000 Toulouse (FR). TREBOSC, Marie-Thérèse [FR/FR]; 19, rue Baron-Cachin, F-81100 Castres (FR).	(74) Mandataire: AHNER, Francis; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR). (81) Etats désignés: AT (brevet européen), BE (brevet européen), CH (brevet européen), DE (brevet européen), DK (brevet européen), ES (brevet européen), FR (brevet européen), GB (brevet européen), GR (brevet européen), IT (brevet européen), JP, LU (brevet européen), NL (brevet européen), SE (brevet européen), US. Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>	
(54) Title: DNA GEL STABILIZED THERMAL WATER LIPOSOMES (54) Titre: LIPOSOMES D'EAUX THERMALES STABILISES DANS UN GEL D'ADN (57) Abstract <p>Thermal water based composition characterized in that it contains thermal water liposomes stabilized in a desoxyribonucleic acid gel and process for its preparation.</p> (57) Abrégé <p>La présente invention a pour objet une composition à base d'eau thermale caractérisée en ce qu'elle comporte des liposomes d'eau thermale stabilisés dans un gel d'acide desoxyribonucléique ainsi qu'un procédé de préparation.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	ES	Espagne	MG	Madagascar
AU	Australie	FI	Finlande	ML	Mali
BB	Barbade	FR	France	MN	Mongolie
BE	Belgique	GA	Gabon	MR	Mauritanie
BF	Burkina Faso	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BG	Bulgarie	GN	Guinée	NL	Pays-Bas
BJ	Bénin	GR	Grèce	NO	Norvège
BR	Brésil	HU	Hongrie	PL	Pologne
CA	Canada	IT	Italie	RO	Roumanie
CF	République Centrafricaine	JP	Japon	SD	Soudan
CG	Congo	KP	République populaire démocratique de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KR	République de Corée	SN	Sénégal
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SU ⁺	Union soviétique
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark				

⁺ Toute désignation de "SU" produit ses effets dans la Fédération de Russie. On ignore encore si une telle désignation produit ses effets dans les autres Etats de l'ancienne Union soviétique.

LIPOSOMES D'EAUX THERMALES STABILISES DANS UN GEL D'ADN

La présente invention concerne des compositions à base d'eau
thermale comportant des liposomes d'eau thermale stabilisés dans un gel
5 d'ADN, utiles notamment en dermatologie et en cosmétologie.

Les liposomes sont des micro-vésicules constitués d'une ou
plusieurs bicouches lipidiques délimitant un espace aqueux central et en cas
de liposomes multi-lamellaires, un comportement aqueux entre deux
bicouches.

10 Ces structures sont composées de phospholipides auxquels on
ajoute fréquemment des stérols tels que le cholestérol pour en augmenter
la stabilité.

Les liposomes peuvent être classés selon leur taille et leur
caractère uni ou multi-lamellaire.

15 MLV (Multi-Lamellar Vesicles) : diamètre 100 à 5000 nm
(plusieurs bicouches)

LUV (Large Unilamellar Vesicles) : diamètre 200 à 2000 nm
(1 bicouche)

20 SUV (Small Unilamellar Vesicles) : diamètre 20 à 80 nm
(1 bicouche)

Des techniques permettant d'obtenir de grandes quantités de
liposomes ont été développées dans l'industrie (ultra-dispersion, sonication,
lipopred.) Réf. PUISIEUX F., DELATTRE J. - Les liposomes. Application
thérapeutiques. Technique et Documentation, Lavoisier Paris, 1985.

25 Ces micro-vésicules sont capables d'interagir avec les
cellules dont les membranes sont de nature identique à celle du liposome.

La dermatologie et la cosmétologie constituent des secteurs
prometteurs pour l'exploitation des liposomes.

Les principales études concernant la peau sont relatives aux
30 liposomes de corticoïdes. Il semblerait que la micro-encapsulation des
corticoïdes diminue la pénétration percutanée du produit et augmente sa
concentration au niveau des sites locaux : épiderme et derme. Réf.
WOHLRAB W., LASCH J. - Penetration Kinetics of liposomal hydrocortisone
in human skin. Dermatologica, 174, 18-22, 1987.

35

D'autres substances ont été incorporées mais les études sont trop parcellaires pour être généralisées : l'EGF (Epidermal Growth Factor) aiderait à la cicatrisation des plaies : les superoxydes dismutases auraient localement une action anti-inflammatoire. Malheureusement les vésicules
5 de liposomes sont très fragiles dans les formulations utilisées et elles sont souvent détruites avant d'atteindre leur cible.

De nombreux auteurs ont mentionné l'utilisation d'agents gélifiants pour stabiliser les vésicules liposomiales sous forme de gel aqueux.

10 Les principaux agents gélifiants utilisés sont : la gélatine, les polymères carboxyviniliques, les polymères métacryliques, les copolymères de polydiméthylsiloxane et plus récemment, le collagène.

La stabilisation des liposomes dans un gel aqueux avec les agents gélifiants actuellement utilisés ne permet pas d'obtenir une stabilité
15 de la formule supérieure à 3 mois à la température de 40°C.

La présente invention permet de pallier à cet inconvénient majeur en stabilisant les liposomes dans un gel d'acide désoxyribonucléique,

Selon l'invention, l'ADN sera de l'ADN hautement polymérisé selon des procédés connus de l'homme de l'Art (ci-après "ADN HP") et
20 disponible commercialement.

On peut citer en particulier de l'ADN présentant une masse moléculaire comprise entre 500.000 et 1 500 000 de préférence entre 800.000 et 1.200.000.

La composition selon l'invention contient avantageusement de
25 0,1 à 10 % en poids d'ADN et plus particulièrement de 0,5 à 5%.

Selon l'invention, on incorpore dans les liposomes des eaux thermales et plus particulièrement l'eau d'AVENE ou l'eau de CAUTERETS. L'eau d'AVENE présente des vertus thérapeutiques utiles dans le traitement des eczémas, prurits, psoriasis, retards de cicatrisation, brûlures. Des études
30 fondamentales ont elles aussi apporté leur caution à l'efficacité de l'EAU D'AVENE. C'est ainsi que plusieurs séries d'études ont permis de démontrer que l'EAU D'AVENE exerce un effet inhibiteur sur la dégranulation des basophiles humains. Elle inhibe également la migration des polynucléaires dont le rôle dans l'inflammation cutanée est important.

L'eau de CAUTERETS sulfurée présente, sous forme de liposomes, un intérêt en dermatologie et plus particulièrement dans les traitements suivants : psoriasis, eczémas, acnée, prurit, séborrhée, alopecie.

5

La composition de l'EAU D'AVENE est la suivante :

10	<u>ANION</u>	mg/l
15	HCO_3^- (bicarbonates).....	218,4
	Cl^- (chlorures).....	5,8
	SO_4^{--} (sulfates).....	12,4
	NO_3 (nitrates).....	1,1
	NO_2^* (nitrites).....	< 0,02
	F^- (fluorures).....	0,12
	PO_4^{---} (phosphates).....	< 0,1
20	Br^- (bromures).....	< 0,1
25	<u>CATIONS</u>	
	Ca^{++} (calcium).....	40,8
	Mg^{++} (magnésium).....	22,7
	K^+ (potassium).....	1,0
	Na^+ (sodium).....	4,8
30	Li^+ (lithium).....	< 0,1
	Fe^{++} (fer).....	< 0,01
	Mn^{++} (manganèse).....	< 0,005
	Sr^{++} (strontium).....	0,13

35

L'eau de CAUTERETS a la composition suivante :

5	<u>ANIONS</u>	mg/l
	HCO_3^{--} (Bicarbonate).....	25
	CO_3^{--} (Carbonates).....	23,4
	H_3SiO_4^- (Silicates).....	32,8
	Cl^- (Chlorures).....	45
10	SO_4^{2-} (Sulfates).....	31,5
	NO_2^- (Nitrites).....	—
	NO_3^- (Nitrates).....	—
	PO_4^{3-} (Phosphates).....	—
	F^- (Fluorures).....	2,2
15	HS^- (Sulfures).....	traces
	SO_3^{2-} (Sulfites).....	traces
	$\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ (Triosulfates).....	5,6
20	<u>CATIONS</u>	
	Ca^{2+} (Calcium).....	5
	Mg^{2+} (Magnésium).....	0,12
	Na^+ (Sodium).....	63,6
25	K^+ (Potassium).....	1,8
	NH_4^+ (Ammonium).....	
	Mn^{2+} (Manganèse).....	
	Al^{3+} (Aluminium).....	
	Zn^{2+} (Zinc).....	
30	Cu^{2+} (Cuivre).....	
	Li^+ (Lithium).....	0,18

Bien entendu, selon la présente invention, toutes autres eaux thermales présentant un intérêt en thérapeutique et/ou cosmétologique, peuvent également être micro-encapsulés afin de permettre une pénétra-
5 tion ciblée de ces eaux au niveau de l'épiderme et du derme;

Selon une caractéristique additionnelle de la présente invention, la composition contient éventuellement en outre, un principe actif associé tel que

- 10 . un agent antibactérien et plus particulièrement le phenonip, l'EDTA, l'acide benzoïque, le parahydroxybenzoate de butyle, l'acide sorbique.
- . un principe vitaminique associé tel que la vitamine E, la vitamine C.
- . ou encore une huile telle que de l'huile de bourrache ou de
15 l'huile d'argan.

Bien entendu, la liste ci-dessus n'est pas limitative.

Ce principe actif associé sera alors présent en particulier dans une quantité 0 de 5 % et le plus souvent de 0,1 à 3 % en poids de la composition.

20 La composition selon la présente invention contient de façon avantageuse de 0,1 à 10 % en poids de lipides entrant dans la constitution des liposomes et plus particulièrement de 0,5 à 5 %, le rapport en poids (lipides)/(eau thermale encapsulée dans les liposomes) est environ de 1/3.

25 Dans un mode de réalisation, les liposomes utilisés dans la présente invention sont de type multilamellaires préparés selon le brevet français 2 634 375.

Dans ce mode de réalisation particulier, les gels de liposomes sont préparés de la manière suivante :

a) les liposomes

30 On prépare une phase liquide constituée essentiellement par une solution de lipides amphiphiles et éventuellement un dit principe actif associé de nature lypophile dans un solvant organique et plus particulièrement l'éthanol.

Cette phase est alors ajoutée sous agitation modérée, dans une solution d'eau thermale contenant éventuellement un dit principe associé de nature hydrophile.

5 Après évaporation sous pression réduite, on obtient une suspension de concentration voulue en liposomes.

Les lipides amphiphiles peuvent être des glycolipides, des phospho-aminolipides, et notamment les phospholipides, par exemple les lécithines (d'oeuf, de soja, etc...).

10 Le solvant est de préférence un alcool miscible à l'eau en toutes proportions, notamment l'éthanol.

La solution de lipides amphiphiles peut contenir en outre une substance de nature lipophile destinée à modifier les caractéristiques physiques (charge électrique, rigidité) ou chimique de la paroi telle que du cholestérol, de la stéarylamine, de l'acide phosphatidique, etc...

15 La concentration des lipides dans le solvant peut être de 0,1 à 10 % en poids, de préférence 1 à 5 % en poids.

Il est avantageux que le volume de solvant utilisé pour la phase (1) soit compris entre 30 et 100 % ; par exemple environ 50 %, du volume d'eau de la phase (2), afin d'obtenir des liposomes de petite taille (notamment de 100 à 300 nm).

20 Ainsi l'invention permet d'obtenir des médicaments, notamment sous forme injectable et des produits cosmétiques qui sont très stables.

b) préparation du gel de liposomes :

25 A la suspension précédente, on introduit sous agitation modérée l'ADN (notamment l'ADN HP) ainsi qu'éventuellement les conservateurs et des parfums.

L'invention permet d'obtenir des liposomes d'eaux thermales parfaitement stabilisés dans un gel.

30 Ces formulations obtenues selon la présente invention, peuvent être utilisées en dermocosmétologie notamment par application topique lorsque la composition comporte un véhicule pour application topique, il peut s'agir de gel conditionné en tube ou système mécanique à pompe, ou de composition aérosol délivrée sous forme de gel.

35

Les exemples suivants sont destinés à illustrer l'invention sans pour autant présenter un caractère limitatif.

EXEMPLE 1 : Préparation du lot de 5 kg de liposomes d'eau d'AVENE à 2 % de lipides.

Matière première :

1 - Phase organique

- | | | |
|----|-------------------------------------|------------|
| 10 | - Phospholipide (Lipoïde 80) SEPPIC | 100 g |
| | - Cholestérol BP | 15 g |
| | - Ethanol 95° | 2,5 litres |

2 - Phase aqueuse

- | | | |
|----|------------------|----------|
| | - Eau d'AVENE | 5 litres |
| 15 | - EDTA disodique | 10 g |

Mode opératoire :

1 - Préparation de la phase organique I

Dans 2,5 litres d'éthanol, on introduit sous forte agitation à température ambiante, 100 g de phospholipide, 10 g de cholestérol et 10 g de phénol. On poursuit l'agitation 1/2 heure jusqu'à dissolution et obtention d'une phase homogène, jaune pâle.

2 - Préparation de la phase aqueuse II

Dans 5 litres d'eau d'Avène, on introduit sous agitation, 10 g d'EDTA disodique.

3 - Préparation des liposomes

On introduit la phase organique I à l'aide d'un Kremlin et d'une pompe péristaltique, par filets, dans la phase aqueuse II.

L'addition sous forte agitation à l'aide d'un Rayneri dure 15 mn. La phase organique doit être introduite en dehors du cône d'agitation. Il se forme une phase laiteuse.

On évapore sous pression réduite 2,7 litres (éthanol + eau). La température du bain-marie est de 50°C. On obtient une solution laiteuse de 4,8 litres à 2 % de lipides que l'on complète à 5 litres avec de l'eau d'AVENE.

EXEMPLE 2 : Préparation de la composition de liposomes d'eau thermale stabilisés par un gel d'ADN HP.

5 A la solution laiteuse précédente contenant 2 % de lipides, on introduit sous agitation modérée et par petites fractions, 100 g d'ADN Hp (commercialisé par la société JAVERNECH). La dissolution s'effectue lentement à température ambiante. Après 1 heure d'agitation, on obtient une formulation stabilisée contenant 2 % de gel d'ADN Hp et 2 % de liposomes.

10

EXEMPLE 3 : Formulations

15 Dans les formulations ci-après, la quantité (en poids) d'eau thermale encapsulée dans les liposomes est de l'ordre de 3 fois celle des lipides constituant les liposomes.

FORMULATION 1 :

20	Lipides	2 %
	ADN HP	2 %
	Phénonip	0,5 %
	EDTA	0,2 %
	Eau d'Avène q.s.p.	100

25

FORMULATION 2 :

	Lipides	2 %
	ADN HP	0,5 %
30	Phenonip	0,5 %
	EDTA	0,2 %
	Eau d'Avène q.s.p.	100

35

FORMULATION 3 :

5	Lipides	2 %
	ADN HP	0,1 %
	Phenonip	0,5 %
	EDTA	0,2 %
	Eau d'Avène q.s.p.	100

10 FORMULATION 4 :

15	Lipides	0,5 %
	ADN HP	0,2 %
	Parahydroxybenzoate de butyle	0,2 %
	Eau florale	1 %
	Eau d'Avène q.s.p.	100

FORMULATION 5 :

20	Lipides	2 %
	ADN HP	0,5 %
	Acide sorbique	0,3 %
	Eau de Cauterets q.s.p.	100

25 FORMULATION 6 :

30	Lipides	1 %
	ADN HP	0,5 %
	Vitamine C	1 %
	Phenonip	0,5 %
	Eau florale	1 %
	Eau de Cauterets q.s.p.	100

35

FORMULATION 7 :

	Lipides		2 %
5	ADN HP		0,5 %
	Extrait de Ginkgo		1 %
	Phenonip		0,5 %
	Eau florale		1 %
	Eau thermale	q.s.p.	100

10

FORMULATION 8 :

	Lipides		0,1 %
	ADN HP		0,5 %
15	Huile de bourrache		1 %
	Phenonip		1 %
	Eau thermale	q.s.p.	100

FORMULATION 9 :

20

	Lipides		10 %
	ADN HP		5 %
	Vitamine E		0,5 %
	Phenonip		1 %
25	Eau thermale	q.s.p.	100

EXEMPLE 4 : Etude de stabilité

30

L'étude de stabilité a été effectuée à 40°C sur des formulations contenant 2 % de liposomes d'eau thermale d'Avène.

35

La visualisation est réalisée au microscope électronique, cette visualisation est effectuée chaque mois après avoir procédé à la coloration négative des liposomes à l'aide d'une solution à 2 % de phosphotungstate de sodium.

Les résultats de cette étude sont résumés dans le tableau suivant :

	temps/mois												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
5	Gélatine 5 %	+	+	-									
	Carbopol 941 (0,5%)	+	+	+	-								
10	Carbopol 910 (0,5%)	+	+	+	-								
	Eudispert HV (0,5%)	+	+	+	+	-							
15	Eudispert MV (0,5%)	+	+	+	-								
	Dimethycone copolyol (2 %)	+	+	+	+	-							
20	Collagène (5 %)	+	+	+	+	-							
	ADN HP (0,1 %)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-		
	ADN HP (0,5 %)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25	ADN HP (2 %)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ = Bonne stabilité (liposome 300 + 30 nm)

30 + = Augmentation taille des liposomes (par fusion membranaire)

- = Séparation des phases (instabilité de la formule).

Les observations photographiques montrent que les liposomes sont bien dispersés dans un réseau de l'ADN HP sans que leur forme et leur taille soient altérées et confirme la stabilité surprenante des liposomes dans cette formulation.

Des autres expériences réalisées, on arrive au résultat que la présence d'ADN selon l'invention permet d'obtenir une stabilisation remarquable des liposomes d'eau minérale selon l'invention lors de leur préparation ainsi que dans les formulations galéniques.

Un taux de 0,5 à 2% d'ADN H.P. permet de stabiliser les liposomes pendant 24 mois, alors qu'avec les gélifiants classiques du type Carbopol et/ou Collagène, la stabilité des membranes liposomiales est maintenue au maximum 6 mois.

Cette stabilité peut être expliquée par la réticulation des fibres d'ADN H.P. en milieu aqueux qui permet la dispersion des liposomes et empêche la fusion des vésicules lipidiques.

EXEMPLE 5 : Activité pharmaceutique et chimique

La vectorisation de l'eau minérale sous forme liposomiale selon l'invention permet d'une façon surprenante de potentialiser l'activité pharmacologique et clinique de cette eau.

Les résultats obtenus sont résumés ci-après.

1. Inhibition de la dégranulation des basophiles humains.

La dégranulation des basophiles humains est observée selon le protocole suivant :

Obtention de basophiles sensibilisés à un antigène donné à partir de prélèvements de malades allergiques ou après sensibilisation passive de basophiles de donneurs par un sérum riche en IgE spécifiques.

Lorsque les basophiles sensibilisés proviennent de malades allergiques, il est nécessaire de procéder à un enrichissement par simple

sédimentation à 1 g et centrifugation du plasma riche en leucocytes. Le culot leucocytaire contient de 1500 à 3000 basophiles/mm³.

Les leucocytes obtenus sont alors mis en suspension dans un
5 tampon minéral puis centrifugés.

L'antigène sensibilisant est alors dilué dans le RPMI 1640 (flows Labo) (7 dilutions de 5 en 5) à partir d'une concentration par exemple de 10⁻³ s'il s'agit d'extraits glycélinés.

Afin d'étudier la vectorisation de l'eau d'Avène sur ce
10 basophile-allergène sensibilisant, l'eau pure et de l'eau distillée sont mises en contact avec un aliquot du culot cellulaire et incubées 30 mn à 25°C. Après ce temps d'incubation, la suspension cellulaire est mélangée volume à volume avec les dilutions de l'antigène, plus un contrôle sans l'antigène.

Le mélange cellules-antigène est mis à incuber 15 mn à 37°C
15 puis coloré par le bleu de toluidine.

Les basophiles non dégranulés sont alors dénombrés dans des hémocytomètres de Malassez ou de Fuchs-Rosenthal.

Résultats

20

Sur le tableau suivant figurent les résultats exprimés en pourcentage maximum de dégranulation pour 15 tests de dégranulation en présence de divers pneumallergènes. Le pourcentage de dégranulation moyen pour les 15 expériences est de 57,1% pour les témoins eau distillée
25 et eau d'Avène de 29,3% et de 14,1% pour les tests réalisés avec des liposomes stabilisés. (Cette différence est hautement significative $p < 0,01$).

30

35

5

Eau distillée	Eau d'Avène	Eau d'Avène liposomes ADN H.P. (5%)
57,1%	29,3%	14,1%

10

Conclusion

La vectorisation de l'eau d'Avène par les liposomes permet une potentialisation de 100% de l'effet inhibiteur de la dégranulation des basophiles.

15

2. Pharmacoclinique

Une potentialisation de l'activité anti-irritante chez l'homme a été étudiée à partir d'un modèle d'irritation cutanée provoquée par le Lauryl Sulfate de Sodium (LSS).

20

Produits testés : (a) Eau distillée

(b) Eau d'Avène

(c) Eau d'Avène (liposomes ADN H.P. - 5%)

25

Les trois produits à étudier sont utilisés comme solvant du LSS afin de réaliser des solutions de même concentration que la solution témoin de LSS constituant le modèle d'irritation. Ils sont appliqués ainsi que le témoin sous patch-test occlusif, pendant 24 heures.

30

L'évaluation de l'intensité de l'irritation cutanée est réalisée par mesure des variations du flux sanguin cutané en Vélocimétrie Laser Doppler (VLD).

35

Protocole (nombre de sujets : 20)

5 Trois solutions de LSS à 0,75% sont préparées à l'aide des produits à étudier (a-b-c). La solution témoin de LSS et les solutions de a, b et c sont appliquées de manière randomisée à raison de $65 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ sur un disque de papier filtre.

10 Un pansement occlusif est ensuite maintenu pendant 24 heures. Après retrait des pansements, la peau est laissée à l'air libre pendant 30 mn avant le début des mesures afin d'éliminer tout effet éventuel de l'occlusion.

15 La mesure du flux sanguin cutané est réalisée par enregistrement VLD durant 10 mn sur chaque zone, d'une part avant l'application des patches pour obtenir la ligne de base physiologique et, d'autre part, 30 mn après le retrait des patches.

 Les résultats sont exprimés par la moyenne des aires sous la courbe.

20 Le pourcentage d'inhibition de l'inflammation par le LSS est calculé à l'aide de la formule suivante :

$$\% = \frac{\text{ASC LSS} - \text{ASC p}}{\text{ASC LSS}} \cdot 100$$

25 ASC LSS = Aire sous la courbe pour la solution de LSS seule

 ASC p = Aire sous la courbe pour les solutions des produits a, b et c

30 Afin de déterminer si l'activité des produits étudiés est significative, une étude statistique au moyen du test t apparié de Student est effectuée sur les résultats obtenus.

Résultats

35 Pourcentage d'inhibition de l'irritation induite par LSS

a	b	c
14 NS	39,8 (S)	82,2 (S)

5

L'étude clinique confirme la potentialisation très nette (> 100%) de l'activité anti-inflammatoire de l'eau d'Avène vectorisée par des liposomes.

10

15

20

25

30

35

REVENDICATIONS

- 5 1. Composition à base d'eau thermale caractérisée en ce qu'elle comporte des liposomes d'eau thermale stabilisés dans un gel d'acide desoxyribonucléique.
- 10 2. Composition selon la revendication 1 caractérisée en ce que l'acide desoxyribonucléique utilisé est hautement polymérisé (ADN HP).
3. Composition selon l'une des revendications 1 à 2, caractérisée en ce qu'elle contient 0,1 % à 10 % de lipides entrant dans la composition des liposomes.
- 15 4. Composition selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle contient de 0,1 à 10 % d'ADN.
- 20 5. Composition selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce qu'elle contient un principe actif associé qui est un agent antibactérien et plus particulièrement le phenonip, l'EDTA, le parahydroxybenzoate de butyle, l'acide sorbique.
- 25 6. Composition selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce qu'elle contient un principe actif associé qui est la vitamine E, la vitamine C, l'huile de bourrache, l'huile d'argan, un extrait de ginkgo biloba.
- 30 7. Composition selon les revendications 1 à 6, caractérisée en ce que l'eau thermale utilisée est plus particulièrement l'eau de Cauterets ou de l'eau d'Avène.
- 35 8. Composition selon l'une des revendications 5 à 7, caractérisée en ce que la composition comporte 0,1 à 3 % en poids dudit principe actif associé.

9. Composition selon les revendications 1 à 8 caractérisée en ce qu'elle comporte en outre un ou des véhicules appropriés pour une utilisation en cosmétologie notamment en dermocosmétologie.

5

10. Procédé de préparation d'une composition comportant un gel de liposomes selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce qu'il comporte les étapes suivantes :

1) On prépare une phase liquide constituée essentiellement par une solution de lipides amphiphiles et éventuellement un dit principe actif associé de nature lipophile dans un solvant organique et plus particulièrement l'éthanol,

2) Cette phase est alors ajoutée sous agitation modérée, dans une solution d'eau thermale contenant éventuellement un dit principe actif associé de nature hydrophile,

3) Après évaporation sous pression réduite, on obtient une suspension de concentration voulue en liposomes,

4) A la suspension précédente, on introduit sous agitation modérée dudit ADN.

20

25

30

35

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 91/00805

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) * According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC <div style="display: flex; justify-content: space-between; padding: 0 10px;"> CIB 5 A61K7/00; A61K47/34 A61K7/48; A61K9/127; A61K35/08; </div>																				
II. FIELDS SEARCHED <div style="text-align: center; margin-top: 10px;">Minimum Documentation Searched †</div> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin-top: 5px;"> <tr> <th style="width: 30%;">Classification System</th> <th style="width: 70%;">Classification Symbols</th> </tr> <tr> <td style="height: 40px; vertical-align: middle; text-align: center;">CIB 5</td> <td style="height: 40px; vertical-align: middle; text-align: center;">A61K</td> </tr> </table> <div style="text-align: center; margin-top: 10px; font-size: small;">Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched *</div>			Classification System	Classification Symbols	CIB 5	A61K														
Classification System	Classification Symbols																			
CIB 5	A61K																			
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT * <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin-top: 5px;"> <tr> <th style="width: 10%;">Category *</th> <th style="width: 60%;">Citation of Document, †† with indication, where appropriate, of the relevant passages ‡</th> <th style="width: 30%;">Relevant to Claim No. ‡</th> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">Y</td> <td>EP,A,0 274 363 (LABORATORIO CHIMICO FARMACEUTICO E. GRANELLI S.P.A.) 13 July 1988 see the whole document ---</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">1-9</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">Y</td> <td>FR,A,2 511 243 (D. GESKIS) 18 February 1983 see the whole document; in particular page 8, claim 4 ---</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">1-9</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">A</td> <td>FR,A,2 609 393 (LABORATOIRES SEROBIOLOGIQUES, S.A.) 15 July 1988 see page 16 - page 17; example 21 ---</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">1-9</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">A</td> <td>FR,A,2 622 104 (BIOETICA, S.A.) 28 April 1989 see the whole document ---</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">1-9</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">A</td> <td>EP,A,0 349 429 (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)) 3 January 1990 see the whole document -----</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">10</td> </tr> </table>			Category *	Citation of Document, †† with indication, where appropriate, of the relevant passages ‡	Relevant to Claim No. ‡	Y	EP,A,0 274 363 (LABORATORIO CHIMICO FARMACEUTICO E. GRANELLI S.P.A.) 13 July 1988 see the whole document ---	1-9	Y	FR,A,2 511 243 (D. GESKIS) 18 February 1983 see the whole document; in particular page 8, claim 4 ---	1-9	A	FR,A,2 609 393 (LABORATOIRES SEROBIOLOGIQUES, S.A.) 15 July 1988 see page 16 - page 17; example 21 ---	1-9	A	FR,A,2 622 104 (BIOETICA, S.A.) 28 April 1989 see the whole document ---	1-9	A	EP,A,0 349 429 (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)) 3 January 1990 see the whole document -----	10
Category *	Citation of Document, †† with indication, where appropriate, of the relevant passages ‡	Relevant to Claim No. ‡																		
Y	EP,A,0 274 363 (LABORATORIO CHIMICO FARMACEUTICO E. GRANELLI S.P.A.) 13 July 1988 see the whole document ---	1-9																		
Y	FR,A,2 511 243 (D. GESKIS) 18 February 1983 see the whole document; in particular page 8, claim 4 ---	1-9																		
A	FR,A,2 609 393 (LABORATOIRES SEROBIOLOGIQUES, S.A.) 15 July 1988 see page 16 - page 17; example 21 ---	1-9																		
A	FR,A,2 622 104 (BIOETICA, S.A.) 28 April 1989 see the whole document ---	1-9																		
A	EP,A,0 349 429 (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)) 3 January 1990 see the whole document -----	10																		
<div style="display: flex; justify-content: space-between; font-size: x-small;"> <div style="width: 45%;"> <p>* Special categories of cited documents: ††</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"Δ" document member of the same patent family</p> </div> </div>																				
IV. CERTIFICATION <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin-top: 5px;"> <tr> <td style="width: 50%; padding: 5px;"> Date of the Actual Completion of the International Search <div style="text-align: center; font-weight: bold;">14 JANUARY 1992 (14.01.1992)</div> </td> <td style="width: 50%; padding: 5px;"> Date of Mailing of this International Search Report <div style="text-align: center; font-weight: bold;">23 JANUARY 1992 (23.01.1992)</div> </td> </tr> <tr> <td style="width: 50%; padding: 5px;"> International Searching Authority <div style="text-align: center; font-weight: bold;">EUROPEAN PATENT OFFICE</div> </td> <td style="width: 50%; padding: 5px;"> Signature of Authorized Officer </td> </tr> </table>			Date of the Actual Completion of the International Search <div style="text-align: center; font-weight: bold;">14 JANUARY 1992 (14.01.1992)</div>	Date of Mailing of this International Search Report <div style="text-align: center; font-weight: bold;">23 JANUARY 1992 (23.01.1992)</div>	International Searching Authority <div style="text-align: center; font-weight: bold;">EUROPEAN PATENT OFFICE</div>	Signature of Authorized Officer														
Date of the Actual Completion of the International Search <div style="text-align: center; font-weight: bold;">14 JANUARY 1992 (14.01.1992)</div>	Date of Mailing of this International Search Report <div style="text-align: center; font-weight: bold;">23 JANUARY 1992 (23.01.1992)</div>																			
International Searching Authority <div style="text-align: center; font-weight: bold;">EUROPEAN PATENT OFFICE</div>	Signature of Authorized Officer																			

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO. FR 9100805
SA 52891**

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 14/01/92

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0274363	13-07-88	FR-A- 2608426 JP-A- 63253015	24-06-88 20-10-88
FR-A-2511243	18-02-83	None	
FR-A-2609393	15-07-88	FR-A- 2627385	25-08-89
FR-A-2622104	28-04-89	DE-A- 3841828 FR-A- 2645455 GB-A- 2226002	13-06-90 12-10-90 20-06-90
EP-A-0349429	03-01-90	FR-A- 2634375 JP-A- 2149336	26-01-90 07-06-90

EPO FORM P0079

For more details about this annex : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

CIB 5 A61K7/00; A61K7/48; A61K9/127; A61K35/08
A61K47/34

II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée⁸

Système de classification

Symboles de classification

CIB 5

A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté⁹III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS¹⁰

Catégorie *	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, ¹² des passages pertinents ¹³	No. des revendications visées ¹⁴
Y	EP,A,0 274 363 (LABORATORIO CHIMICO FARMACEUTICO E. GRANELLI S.P.A.) 13 Juillet 1988 voir le document en entier ---	1-9
Y	FR,A,2 511 243 (D. GESKIS) 18 Février 1983 voir le document en entier; en particulier page 8, revendication 4 ---	1-9
A	FR,A,2 609 393 (LABORATOIRES SEROBIOLOGIQUES, S.A.) 15 Juillet 1988 voir page 16 - page 17; exemple 21 ---	1-9
A	FR,A,2 622 104 (BIOETICA, S.A.) 28 Avril 1989 voir le document en entier ---	1-9
A	EP,A,0 349 429 (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)) 3 Janvier 1990 voir le document en entier ---	10

* Catégories spéciales de documents cités:¹¹

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.

"A" document qui fait partie de la même famille de brevets

IV. CERTIFICATION

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
14 JANVIER 1992	23. 01. 92
Administration chargée de la recherche internationale	Signature du fonctionnaire autorisé
OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	BENZ K. F. <i>Benr</i>

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 9100805
SA 52891

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets. 14/01/92

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A-0274363	13-07-88	FR-A- 2608426 JP-A- 63253015	24-06-88 20-10-88
FR-A-2511243	18-02-83	Aucun	
FR-A-2609393	15-07-88	FR-A- 2627385	25-08-89
FR-A-2622104	28-04-89	DE-A- 3841828 FR-A- 2645455 GB-A- 2226002	13-06-90 12-10-90 20-06-90
EP-A-0349429	03-01-90	FR-A- 2634375 JP-A- 2149336	26-01-90 07-06-90

EPO FORM P0072

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82